

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 3 月 25 日 (25.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/024752 A1

(51) 国際特許分類: C07K 1/14, 16/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011642

(22) 国際出願日: 2003 年 9 月 11 日 (11.09.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-265609 2002 年 9 月 11 日 (11.09.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 竹田 浩三 (TAKEDA, Kozo) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP). 越智 教道 (OCHI, Norimichi) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP). 石井 公恵 (ISHII, Kimie) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP). 松橋 学 (MATSUHASHI, Manabu) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 中外製

薬株式会社内 Tokyo (JP). 今村 暁則 (IMAMURA, Akinori) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 206 区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF PURIFYING PROTEIN

(54) 発明の名称: タンパク質精製方法

(57) Abstract: Problem: To provide a method of purifying a physiologically active protein (in particular, an antibody) whereby impurities such as DNA contaminants and viruses can be surely removed by a simple procedure at a low cost with little loss of the physiologically active protein. Means for Resolution: A method of removing impurities in a sample containing a physiologically active protein which comprises the following steps: 1) preparing an aqueous solution of the physiologically active protein-containing sample having a conductivity at a pH value lower than the isoelectric point of the physiologically active protein; and 2) removing the thus formed particles.

(57) 要約: 課題: より簡単な方法で、DNA 夾雑物やウイルスといった不純物を確実に除去でき、しかも生理活性タンパク質の損失が少なく、かつ実施コストの低い生理活性タンパク質、特に抗体の精製方法を提供する。解決手段: 以下の段階: 1) 生理活性タンパク質含有試料を、該生理活性タンパク質の等電点よりも低い pH の低伝導度水溶液状態とし、2) 生じる粒子を除去する、を含む、生理活性タンパク質含有試料中の不純物を除去する方法。

明細書

タンパク質精製方法

技術分野

本発明はタンパク質の精製方法に関し、さらに詳しくは抗体などの生理活性タンパク質を含有する試料中から夾雑物としてのDNAといった不純物を除去する方法に関する。

背景技術

遺伝子組換え技術の発達によって、種々のタンパク質製剤が安定した供給量で提供されるようになった。特に、近年通常の医薬品に比べて選択性の高い様々な抗体医薬品が遺伝子組換え技術によって開発されており、臨床試験に入っている。

このような遺伝子組換え技術によって産生された生理活性タンパク質を含有する製剤においては、宿主DNAやウイルスの汚染による不純物、例えばDNA夾雑物を除去する必要がある。現在、バイオ医薬品におけるDNAの許容量は100 pg DNA／一投与量以下であることが世界保健機構（WHO）により示されている。この基準を満たすために、一般には、宿主細胞から得られる生理活性タンパク質を含有する水性培地を陰イオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、もしくはこれらの組合せで処理することによりDNAを除去している。

特に、生理活性タンパク質が哺乳動物細胞を宿主として得られた抗体であるときには、プロテインAもしくはプロテインGがIgGのFc鎖に結合する性質を利用して、プロテインAもしくはプロテインGのアフィニティカラムクロマトグラフィー処理を行った後に種々のクロマトグラフィーで精製している。

例えば、特表平5-504579号では、哺乳動物細胞培養から得られた抗体含有水性培地をプロテインAもしくはプロテインGカラムクロマトグラフィーに適用して抗体をカラムに吸収させ、次いで酸性溶液（濃度約0.1 Mのクエン酸、pH 3.0-3.5）を用いて抗体を溶出させ、得られる酸性溶出液をイオン交換カラムクロマトグラフィー、サイズ排除カラムクロマトグラフィーに順次適用して精製している。

しかし、これらの各種クロマトグラフィー工程やその組合せは時間、労力、コストがかかり、煩雑であり、また効果も安定していない。

本発明の目的は、より簡単な方法で、確実にDNA夾雑物やウイルスといった不純物を除去でき、しかも生理活性タンパク質の損失が少なく、かつ実施コストの低い生理活性タンパク質、特に抗体の精製方法を提供することである。

発明の開示

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究した結果、驚くべきことに、生理活性タンパク質含有試料を、生理活性タンパク質の等電点より低いpHで低伝導度水溶液にし、生じた粒子をフィルター濾過することにより、煩雑なクロマトグラフィー工程を行わずにDNA夾雑物やウイルスといった不純物を効率よく除去できることを見出してして本発明を完成した。

すなわち、本発明は、以下のものを提供する。

(1) 以下の段階：

1) 生理活性タンパク質含有試料を、該生理活性タンパク質の等電点以下のpHの低伝導度の水溶液状態とし、

2) 生じる粒子を除去する、

を含む、生理活性タンパク質含有試料中の不純物を除去する方法。

(2) 低伝導度の水溶液の伝導度が、0～100mMのモル濃度である前記(1)記載の方法。

(3) 低伝導度の水溶液のイオン強度が、0～0.2である前記(1)又は(2)記載の方法。

(4) 低伝導度の水溶液の導電率が、0～300 mS/mである前記(1)～(3)のいずれかに記載の方法。

(5) 溶液が塩酸、クエン酸、酢酸の水溶液から選択される前記(1)～(4)のいずれかに記載の方法。

(6) 水溶液のpHが生理活性タンパク質の等電点以下、かつpH2.0以上である前記(1)～(5)のいずれかに記載の方法。

(7) 不純物がDNA夾雑物である(1)～(6)のいずれかに記載の方法。

(8) 不純物がウイルスである(1)～(6)のいずれかに記載の方法。

(9) DNA 夾雑物除去処理後の生理活性タンパク質含有試料中の DNA 夾雑物が DNA 濃度 22.5pg/ml 以下である(7)に記載の方法。

5 (10) 生理活性タンパク質が抗体である前記(1)～(9)のいずれかに記載の方法。

(11) 抗体が IgG 抗体である前記(10)に記載の方法。

(12) 抗体がヒト型化モノクローナル抗体である前記(10)又は(11)に記載の方法。

10 (13) 抗体がヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体である前記(12)記載の方法。

(14) 抗体がヒト型化抗 HM1.24 抗原モノクローナル抗体である前記(12)記載の方法。

(15) 抗体がヒト型化抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体(抗 PTHrP 抗体)である前記(12)記載の方法。

15 (16) 生理活性タンパク質が顆粒球コロニー刺激因子である前記(1)～(9)のいずれかに記載の方法

(17) 粒子をフィルター濾過によって除去する前記(1)～(16)のいずれかに記載の方法。

20 (18) 生理活性タンパク質含有試料を低伝導度の酸性またはアルカリ性水溶液状態とし、得られる試料に緩衝液を添加して pH を該生理活性タンパク質の等電点以下の pH に調整することによって 1) の工程を行う、(1)の方法。

25 (19) 生理活性タンパク質が抗体であって、該抗体含有試料をプロテイン A もしくはプロテイン G のアフィニティクロマトグラフィーに適用して、低伝導度の酸性水溶液で溶出し、得られる溶出液に緩衝液を添加して pH を該抗体の等電点以下の pH に調整することによって 1) の工程を行う、(1)の方法。

(20) 緩衝液が Tris 水溶液である前記(18)又は(19)記載の方法。

(21) 前記(1)～(20)のいずれかに記載の方法によって得られる精製生理活性タンパク質。

(22) 前記(1)～(20)のいずれかに記載の方法を用いた精製工程を含む、

医療用タンパク質製剤の製造方法。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法で精製する生理活性タンパク質含有試料に含まれる生理活性タンパク質は、例えば、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、エリスロポエチン（EPO）、トロンボポエチン等の造血因子、インターフェロン、IL-1やIL-6等のサイトカイン、モノクローナル抗体、組織プラスミノゲン活性化因子（TPA）、ウロキナーゼ、血清アルブミン、血液凝固第VII因子、レプチン、インシュリン、幹細胞成長因子（SCF）などを含むが、これらに限定されない。タンパク質の中でも、G-CSF、モノクローナル抗体等の抗体が好ましく、さらに好ましくはモノクローナル抗体である。プロテインAもしくはプロテインGアフィニティクロマトグラフィーを用いて実施する本発明の態様では、モノクローナル抗体が好ましい。抗体はIgG、IgA、IgE、IgD、IgMに分類されるが、IgG抗体が好ましい。

生理活性タンパク質とは、哺乳動物、特にヒトの生理活性タンパク質と実質的に同じ生物学的活性を有するものであり、天然由来のもの、および遺伝子組換え法により得られたものを含むが、好ましいのは遺伝子組換え法により得られたものである。遺伝子組換え法による生理活性タンパク質は、大腸菌などの細菌類；イースト菌；チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、C127細胞、COS細胞などの動物由来の培養細胞などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したものが用いられる。遺伝子組換え法によって得られるタンパク質には天然タンパク質とアミノ酸配列が同じであるもの、あるいは該アミノ酸配列の1又は複数を欠失、置換、付加したもので前記生物学的活性を有するものを含む。さらには、生理活性タンパク質はPEG等により化学修飾されたものも含む。

生理活性タンパク質が糖鎖を有するタンパク質である場合、糖鎖の由来としては、特に制限はないが、哺乳動物細胞に付加される糖鎖が好ましい。哺乳動物細胞には、例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、BHK細胞、COS細胞、ヒト由来の細胞等があるが、この中でも、CHO細胞が最も好まし

い。

生理活性タンパク質がEPOである場合には、EPOはいかなる方法で製造されたものでもよく、ヒト尿より種々の方法で抽出し、分離精製したもの、遺伝子工学的手法（例えば特開昭61-12288号）により大腸菌などの細菌類、イ
5 ースト菌、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、BHK細胞、COS細胞、ヒト由来の細胞などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したものが用いられる。さらには、PEG等により化学修飾されたEPOも含む（国際特許出願公開番号WO90/12874参照）。さらに、糖鎖のついていないEPOをPEG等により化学修飾したものも含む。また、EPOのアミノ酸配列中のN
10 -結合炭水化物鎖結合部位もしくはO-結合炭水化物鎖結合部位において、1以上のグリコシル化部位の数を増加させるように改変したEPO類似体も含む（例えば、特開平8-151398号、特表平8-506023号参照）。さらには、糖鎖結合部位の数は変化させずに、シアル酸等の含量を増加させることにより糖鎖の量を増加させたものであってもよい。

15 生理活性タンパク質がG-CSFである場合には、G-CSFは高純度に精製されたG-CSFであれば全て使用できる。本発明におけるG-CSFは、いかなる方法で製造されたものでもよく、ヒト腫瘍細胞の細胞株を培養し、これから種々の方法で抽出し分離精製したもの、あるいは遺伝子工学的手法により大腸菌などの細菌類；イースト菌；チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、C1
20 27細胞、COS細胞などの動物由来の培養細胞などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したものが用いられる。好ましくは大腸菌、イースト菌又はCHO細胞によって遺伝子組換え法を用いて生産されたものである。最も好ましくはCHO細胞によって遺伝子組換え法を用いて生産されたものである。さらには、PEG等により化学修飾されたG-CSFも含む（国際特許出願公開番号WO9
25 0/12874参照）。

生理活性タンパク質がモノクローナル抗体である場合には、モノクローナル抗体はいかなる方法で製造されたものでもよい。モノクローナル抗体は、基本的には公知技術を使用し、感作抗原を通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリー

ニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作成できる。

また、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた遺伝子組換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。具体的には、ハイブリドーマの mRNA から逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V 領域）の cDNA を合成する。目的とする抗体の V 領域をコードする DNA が得られれば、これを所望の抗体定常領域（C 領域）をコードする DNA と連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体の V 領域をコードする DNA を、抗体 C 領域の DNA を含む発現ベクターへ組み込んでもよい。発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト型化（Humanized）抗体などを使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードする DNA をヒト抗体の定常領域をコードする DNA と連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域（CDR; complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体の CDR とヒト抗体のフレームワーク領域（framework region; FR）を連結するように設計した DNA 配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌ

クレオチドから PCR 法により合成する。得られた DNA をヒト抗体定常領域をコードする DNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号 EP 239400、国際特許出願公開番号 WO 96/02576 参照）。CDR を介して連結されるヒト抗体の FR は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

このような再構成ヒト型化抗体としてヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体（h PM-1）が好ましく例示される（国際特許出願公開番号 WO 92-19759 を参照）。また、ヒト型化抗 HM1.24 抗原モノクローナル抗体（国際特許出願公開番号 WO 98-14580 を参照）、ヒト型化抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体（抗 PTHrP 抗体）（国際特許出願公開番号 WO 98-13388 を参照）、ヒト型化抗組織因子抗体（国際特許出願公開番号 WO 99-51743 を参照）なども本発明で使用する好ましい抗体である。

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球を *in vitro* で所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えば U266 と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平 1-59878 参照）。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる（国際特許出願公開番号 WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735 参照）。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードする DNA 配列を決定することができる。抗原に結合する scFv の DNA 配列が明らかになれば、当該配列に基づいて適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に

衆知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388 を参考にすることができる。

さらに、トランスジェニック動物等によって作製されたヒト抗体も好ましい。

- さらに、抗体には Fab, (Fab')₂, Fc, Fc', Fd などの抗体断片や、1 価又は 2 価以上の一本鎖抗体 (scFV) などの再構成したものも含む。

本発明では、生理活性タンパク質含有試料もしくは抗体含有試料とは、好ましくは、培養により得られた生理活性タンパク質もしくは抗体を含む CHO 細胞などの哺乳動物細胞の培養培地、あるいはこれに部分的精製などの一定の処理を施したものをいう。

- 10 本発明の好ましい態様では、以下の段階：

1) 生理活性タンパク質含有試料を、該生理活性タンパク質の等電点以下の pH の低伝導度水溶液状態とし、

2) 生じる粒子を除去する、

を含む方法によって、生理活性タンパク質含有試料中の不純物を除去する。

- 15 本発明の方法によって除去される不純物は、目的のタンパク質以外の物質であれば、いかなる物質でもよい。不純物の例としては、DNA 夾雑物、ウイルス、プロテイン A (カラムからの溶出物)、エンドトキシン、HCP (細胞由来蛋白質)、培地成分である Hy-Fish (FL)、IGF などを挙げることができるが、好ましくは DNA 夾雑物又はウイルスである。ここで DNA 夾雑物とは、生理活性タンパク質含有試料中の DNA であり、宿主由来の DNA や汚染したウイルス由来の DNA
- 20 が含まれる。

- 本発明の方法によって除去されるウイルスには特に制限はなく、どのようなウイルスを除去してもよく、DNA ウイルス及び RNA ウイルスが含まれる。RNA ウイルスとしては、X-MuLV といったレトロウイルス、Reo 3 といったレオウイルス、MVM といったパラボウイルスが挙げられる。本発明の方法によって除
- 25 去されるウイルスの具体的な例としては、例えば、X-MuLV、PRV、Reo 3、MVM、VSV、ヘルペスシンプレックス、CHV、シンドピス、ムンプス、ワクチニア、Measle、Rubella、インフルエンザ、ヘルペスゾスター、サイトメガロ、パラインフルエンザ、EB、HIV、HA、HB、NANB、ATL、ECHO、バルボなどを

挙げることができるが、好ましくは、X-MuLV、Reo 3、MVM、PRV である。

本発明において、低伝導度水溶液とは、通常、モル濃度が 0～100 mM、好ましくは 0～50 mM、さらに好ましくは 0～30 mM の水溶液または、イオン強度が 0～0.2、好ましくは 0～0.12 の水溶液または、導電率が 0～300 mS/m、

5 好ましくは 0～200 mS/m、さらに好ましくは 0～150 mS/m の水溶液をいう。

生理活性タンパク質の等電点とは、水溶液中において生理活性タンパク質の電荷が見かけ上なくなる pH の値である。等電点は当業者に公知の方法により測定することが可能であり、例えば、種々の pH の溶液中で電気泳動を行い生理活性タンパク質が移動しなくなる pH を求める等電点電気泳動などにより測定することが可能である。生理活性タンパク質の等電点以下の pH は、好ましくは生理活性タンパク質の等電点未満の pH である。

本発明の方法において、不純物が DNA である場合、生理活性タンパク質の等電点以下の pH にすることにより生理活性タンパク質を正に帯電させ、さらに DNA を負に帯電させることが好ましい。

15 通常、DNA はバックボーン中のリン酸基により非常に強い負イオンの電荷を有している（核酸の強酸性リン酸ジエステル結合内のリン酸基の pK 値は約 1 である）ので、DNA を負に帯電させる pH は特に限定されず、生理活性タンパク質の等電点以下の好ましい pH を用いることが可能である。生理活性タンパク質の等電点以下の好ましい pH は、生理活性タンパク質ごとに異なると考えられるので、当業者は公知の方法（例えば、実施例に記載されているように複数の異なる pH の試料を調製し、DNA 除去率やタンパク質回収率などを測定する、などの方法）により生理活性タンパク質の等電点以下の好ましい pH を選択することが可能である。そのような pH としては、通常 pH 2.0 以上、好ましくは pH 3.0 以上、特に好ましくは pH 4.0 以上である。

25 DNA が負に帯電していることを確認するには公知の方法、例えば電気泳動によるタイトレーションカーブ（ETC）を用いた方法（Ion Exchange Chromatography Principles and Methods, Pharmacia(現 Amersham Biosciences), p52～p56）により調べることができる。

さらに、本発明の方法では、生理活性タンパク質含有試料を低伝導度の酸性ま

たはアルカリ性水溶液状態とし、得られる試料に緩衝液を添加してpHを該生理活性タンパク質の等電点以下のpHに調整することも可能である。

従って、本発明の別の好ましい態様では、以下の段階：

1) 生理活性タンパク質含有試料を低伝導度の酸性またはアルカリ性水溶液状態とし、

2) 得られる試料に緩衝液を添加してpHを該生理活性タンパク質の等電点以下のpHに調整し、

3) 生じる粒子を除去する、

を含む方法によって、生理活性タンパク質含有試料中の不純物を除去する。本発明の方法によって除去される不純物は、前述の通りである。

本発明における低伝導度の酸性水溶液とは、モル濃度が0～100mM、好ましくは0～50mM、さらに好ましくは0～30mMの水溶液または、イオン強度が0～0.2、好ましくは0～0.12の水溶液または、導電率が0～300mS/m、好ましくは0～200mS/m、さらに好ましくは0～150mS/mの水溶液であって、pH2.0～3.9、好ましくはpH2.0～3.0の水溶液をいう。酸性水溶液は、塩酸、クエン酸、酢酸などの水溶液から選択してよい。精製しようとする生理活性タンパク質、抗体の種類により、使用する低伝導度の酸性水溶液の種類、伝導度、pHはそれぞれ異なっており、当業者は本明細書に記載の方法に従って予備試験を行うことにより、これらの最適条件を容易に設定できる。

また、本発明の方法で使用する低伝導度のアルカリ性水溶液とは、モル濃度が0～100mM、好ましくは0～50mM、さらに好ましくは0～30mMの水溶液または、イオン強度が0～0.2、好ましくは0～0.12の水溶液または、導電率が0～300mS/m、好ましくは0～200mS/m、さらに好ましくは0～150mS/mの水溶液であって、一般にはpH7.5～13である（pHは精製しようとする生理活性タンパク質、抗体の種類により、それぞれ異なっている）。

本発明の方法では、生理活性タンパク質含有試料を低伝導度の酸性またはアルカリ性水溶液状態とした後、得られる試料に緩衝液を添加してpHを該生理活性タンパク質の等電点以下のpHに調整する。緩衝液としては、例えばTris-HCl、リン酸、Tris、Na₂HPO₄、NaOHなどを挙げることができる。

さらに本発明では、例えば、生理活性タンパク質が抗体の場合、一般的に、抗体含有試料をプロテインAもしくはプロテインGのアフィニティクロマトグラフィーに適用して、低伝導度の酸性水溶液で溶出し、得られる溶出液に緩衝液を添加してpHを生理活性タンパク質の等電点以下で好ましいものに調整することが可能である。

従って、本発明のさらに別の好ましい態様では、以下の段階：

1) 抗体含有試料をプロテインAもしくはプロテインGのアフィニティクロマトグラフィーに適用して、低伝導度の酸性水溶液で溶出し、

2) 得られる溶出液に緩衝液を添加してpHを該生理活性タンパク質の等電点以下のpHに調整し、

3) 生じる粒子を除去する、

を含む方法によって、生理活性タンパク質含有試料中の不純物を除去する。本発明の方法によって除去される不純物は、前述の通りである。

この方法で使用する低伝導度の酸性水溶液は上記したものを使用することができ、また緩衝液としては、例えば Tris-HCl、リン酸、Tris、 Na_2HPO_4 、NaOHなどを挙げるができる。

本発明の方法では、上記段階で生理活性タンパク質の等電点以下のpHになった溶液は粒子（白濁）を生じる。この粒子をフィルター濾過によって除去することによって、DNA夾雑物といった不純物を効率よく除去することができる。濾過に用いるフィルターは、例えば、 $1.0 \sim 0.2 \mu\text{m}$ の Cellulose Acetate Filter System (Corning 製) もしくは TFF などを用いることができるが、これらに限定されるものではない。

また、上記粒子を除去するための方法としては遠心分離操作等も考えられ、粒子を効率的に除去できる手法であればよく、フィルター濾過に限定されるものではない。

本発明者らは特別の理論に拘束されるものではないが、不純物がDNAである場合、上記粒子は生理活性タンパク質とDNAとによって形成される複合体であると推定している。タンパク質が等電点より低いpHになることにより正に帯電し、一方、DNAが負に帯電することにより、DNAとタンパク質の複合体が形

成されると推定している。さらに、低伝導度の水溶液にすることにより、より複
合体が形成されやすくなると考えている。粒子をフィルター除去することによっ
て DNA-生理活性タンパク質複合体中に含まれる生理活性タンパク質が少量ロス
となるが、生理活性タンパク質の全体からすると数%であり、後述する実施例に
5 記載するように、生理活性タンパク質の約 90%を回収することができた。

また、この DNA-生理活性タンパク質複合体が樹脂上で生じるためにプロテイン
AもしくはプロテインGカラムクロマトグラフィー単独では DNA 夾雑物とタン
パク質の分離が効果的に行えないのではないかと推測している。本発明の
方法により精製された生理活性タンパク質は、さらに陽イオン交換クロマトグラ
10 フィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグ
ラフィー、もしくはこれらの組合せなどにより精製して医薬製剤に用いることが
できる。

DNA 定量法としてはスレッシュホールド総 DNA 定量法により測定し、測定に
先だって DNA 抽出操作を実施するが、これらに限定されるものではない。

15 ウイルス定量法としては、検出細胞へのウイルス感染力を指標とした TCID₅₀
(tissue culture infective dose (50%) ; 50%培養細胞感染量)、並びに画分中の
ウイルス量を定量できる RT/Q-PCR および Q-PCR により測定するが、これらに
限定されるものではない。

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれ
20 に限定されない。本発明の記載に基づき種々の変更、修飾が当業者には可能であ
り、これらの変更、修飾も本発明に含まれる。

実施例

25 実施例 1 : hPM-1 (ヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体) 精製におけるプ
ロテインAアフィニティクロマトグラフィーの緩衝液組成の検討

1. 1. 試験方法

(1)検討材料 (抗体含有試料)

hPM-1 抗体 (ヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体) 産生 CHO 細胞培養上
清液(以下 CM と略す)(細胞遠心除去済み:-80℃保存)含有試料は、上記 CM を 0.22

μ m Cellulose Acetate(CA と略す)Filter System (CORNING)を用いて濾過し、精製検討に使用した。なお、h P M-1 抗体は、国際特許出願公開番号WO 9 2 / 1 9 7 5 9 号公報の実施例 1 0 に記載されたヒトエロンゲーシオンファクター I α プロモーターを利用し、特開平 8-9 9 9 0 2 号公報の参考例 2 に記載された方法に準じて作成した（等電点：p H 9. 0）。

(2)使用機器

塩酸溶出検討時

HPLC : L-6200 Intelligent Pump(HITACHI)

L-4200 UV-VIS Detector(HITACHI)

10 D-2500 Chromato-Integrator(HITACHI)

カラム : HR5/2(Pharmacia 社),5mmI.D.×20mmH

Media : POROS 50A(PerSeptive 社),0.4ml

Lot:A250-039,Code;SPECIAL

粒子検討時

15 HPLC : Waters PrepLC4000 System(Waters)

Waters2000 System Controller(Waters)

Waters486 Tunable Absorbance Detector(Waters)

Waters741 Data Module(Waters)

分光光度計 : U-2000(HITACHI)

20 カラム : XK26(Pharmacia 社),26mmI.D.×100mmH

Media : POROS 50A(PerSeptive 社),53ml

Lot:A250-039,Code;SPECIAL

(3)分析、定量法

h P M-1 定量法 : 直線濃度勾配法による PLRP-S カラム(ポリマーラボラトリーズ社)を用いる逆相 HPLC により定量する。

DNA 量測定法 : スレッショールド総 DNA 定量法により測定する。測定に先だって DNA 抽出操作 (DNA エキストラクターキット<和光純薬>等) を実施する。また、測定にはスレッショールド総 DNA 定量キット (モレキュラーデバイス社製) を用いる。

濁度測定法：粒子形成の状況をモニターするために測定サンプルを分光光度計 U-2000(HITACHI)に供し、660nm における吸収を測定する。

1. 2. 溶出条件の検討

- 5 プロテインAアフィニティークロマトグラフィーにおいて溶出液として用いる緩衝液組成を変更した検討を行い、h P M-1 回収率及び溶出液による DNA 除去状況を確認した。上記抗体含有試料を以下の表 1 に示す条件でカラムにかけた。表 1 に示す平衡化緩衝液にてプロテインA樹脂を平衡化し、続いて上記抗体含有試料負荷、その後、洗浄 1、洗浄 2、溶出と実施する。溶出プロファイルを A280nm で監視し、タンパク質のピークを単離した。なお、表中 C-P Buffer はクエン酸ー
- 10 リン酸緩衝液を示す。

表 1

	溶出法 1	溶出法 2	溶出法 3
平衡化	1M NaCl/100mM C-P Buffer pH7.5	1M NaCl/10mM C-P Buffer pH7.5	1M NaCl/100mM C-P Buffer pH7.5
洗浄 1	1M NaCl/100mM C-P Buffer pH7.5	1M NaCl/10mM C-P Buffer pH7.5	1M NaCl/100mM C-P Buffer pH7.5
洗浄 2	100mM C-P Buffer pH7.5	10mM C-P Buffer pH7.5	100mM C-P Buffer pH7.5
溶出	100mM C-P Buffer pH2.6	2.5mM HCl pH2.6	2.5mM HCl pH2.6

溶出法 1、2、3 において、クロマトグラム上で差異は確認されなかった。

- 15 また、各溶出面分を 300mM Tris 溶液で pH7.0 に調整したところ、塩酸溶出面分(溶出法 2、溶出法 3)では粒子が生じた。更に、粒子形成と h P M-1 回収率及び残存 DNA 量との相関を求める検討をも行った。

- 20 粒子相関検討として、溶出法 2 における溶出液塩酸中に NaCl を添加し、添加 NaCl 濃度(0mM,50mM,100mM)と各種要因との相関を求めた。添加 NaCl 濃度と各種要因との相関検討として、それぞれの NaCl 添加による Protein A 溶出面分を 300mM Tris 溶液で pH7.0 に調整したサンプルを濾過前、その pH 調整後サンプルを 0.22 μ m CA Filter にて濾過したサンプルを濾過後とした。濾過前及び濾過後サンプルを上記測定法で h P M-1 回収率(濾過後のみ)を測定し、残存

DNA 量を測定した。

1. 3. 回収率

各溶出条件における h P M-1 回収率を測定した。その結果、溶出法 1 における回収率は 98.6%と良好であった。また溶出法 2 における回収率では 83.8%～97.1%、溶出法 2 における回収率では 83.5%～93.7%とばらつきが生じたが、検討スケールが小さい要因(樹脂量:0.4ml)から生じるばらつきであると推測された。そこで、精製スケールをアップした検討(溶出法 2)では安定して h P M-1 回収率 90%以上を示す事を確認した。従って、塩酸溶出の場合であっても、h P M-1 の回収率は良好であることが判明した。

10 1. 4. 溶出液塩酸中の添加 NaCl 濃度と各種要因相関

溶出液塩酸中の添加 NaCl 濃度と各種要因相関を調べた結果を表 2 に示す。

表 2

NaCl 添加量	0mM	50mM	100mM
濁度(pH 調整前)	0.004	0.007	0.011
濁度(pH 調整後)	0.252	0.049	0.020
HPM-1 回収率(濾過後)(%)	81	86	88
DNA 量(濾過前)(pg DNA/mg hPM-1)	98	220	241
DNA 量(濾過後)(pg DNA/mg hPM-1)	11	30	250

15 濾過後の h P M-1 回収率は 100mM NaCl 添加サンプルで 88%を示し、順に 50mM NaCl 添加の 86%、0mM NaCl 添加の 81%であった。残存 DNA 量に関しては、濾過前後のサンプルでともに、0mM NaCl 添加サンプルが低値を示し、特に濾過後の 0mM NaCl 添加サンプルでは 11pg DNA/mg h P M-1 と極めて低値であった。

20 また、pH 調整後サンプルにおいて濁度の高値なサンプル程、濾過後の h P M-1 回収率及び残存 DNA 量が低値を示している。この結果は、粒子形成に h P M-1 及び DNA が関与している可能性が高い事を示すものである。おそらく pH を 7.0 に調整する事により h P M-1 と DNA が相互作用し粒子を生じると推測される。h P M-1 回収率を高くするという点からは、添加 NaCl 濃度を増加さ

せることが好ましく、逆に残存 DNA 量減少を重視するという点からは、溶出液塩酸中に NaCl を無添加とすることが望ましい。

実施例 2 : ヒト型化抗 PTHrP 抗体の精製

- 5 ヒト型化抗 PTHrP 抗体含有試料 (CHO 細胞で培養した培養上清を 0.45+0.2 μ m CA SARTOBAN P フィルター (sartorius) で濾過したもの) を プロテイン A アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いる方法で以下の条件により精製した。なお、PTHrP 抗体は、国際特許出願公開番号 WO 98 / 1 3 3 8 8 号公報に記載の方法によって作成した (等電点 : pH 8.3)。

10 2. 1. 実験条件

精製装置 : AKTA explorer (Amersham Pharmacia Biotech)

カラム : HR5/5, C10, XK-26 (Amersham Pharmacia Biotech)

樹脂 : rProtein A Sepharose Fast Flow

負荷 : 培養上清直接負荷 (pH 6.6~7.5)

- 15 溶出画分調整 : 1M Tris 水溶液により各種 pH に調整し、0.2 μ m Cellulose Acetate (以下 CA と略す) フィルター濾過により DNA を除去 (以下の (1) において条件を検討)。

- 20 プロテイン A カラムを 150mM NaCl 入りクエン酸-リン酸緩衝液 pH 7.5 で十分に平衡化した後、上記抗体含有 CM を負荷した。続いて結合していない不純物を 150mM NaCl 入りクエン酸-リン酸緩衝液 pH 7.5 で洗浄、更に導電率を下げる目的でクエン酸-リン酸緩衝液 pH 7.5 で洗浄を行い、その後 20mM クエン酸水溶液にて溶出を実施した。溶出プロファイルを A280nm で監視し、タンパク質ピークを分取した。このプロテイン A 溶出画分を用いて以下の条件検討を実施した。

2. 2. 溶出後の残存 DNA 除去条件検討

- 25 残存 DNA を効率的に除去するために、フィルター濾過時の最適 pH 条件を設定する検討を行った。プロテイン A 溶出画分を、1.0M Tris 水溶液により以下の各検討 pH (未調整 (2.7), 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5) に調整した。その後、一定時間放置し、0.22 μ m CA フィルター濾過処理を行った。その後 1.0M Tris 水溶液により pH 7 に調整し、DNA 定量を行った。表 3 に各検討 pH 及び放置時

間と残存 DNA の結果示す。

表 3

残存 DNA 除去検討結果 (単位 : pg / mL)

	pH 7.5	pH 7.0	pH 6.5	pH 6.0	pH 5.5	pH 5.0	pH 4.5	pH 4.0	Direct (pH2.7)
0 hr.	984	83.3	53.8	< 22.5	< 15.0	17.2	54.1	32,052	40,878
6 hr.	816	51.9	< 15.0	< 22.5	< 15.0	< 15.0	44.0	38,172	42,078
24 hr.	310	46.6	< 15.0	< 22.5	< 15.0	< 15.0	39.7	42,528	30,222

- 5 (培養上清中の DNA: 6,637,200 pg / mL、フィルター未処理中の DNA: 25,110 pg / mL)

- 10 表から明らかなように、pH5.5、6.0 における 0,6,24 時間放置すべてにおいて DNA が検出限界以下となった。また DNA 除去状況に関しては pH5.5、6.0 を中心として pH が高く、又は低くなるにつれて DNA 除去の効率が悪くなることが観察された。

実施例 3 : ヒト型化抗 HM 1. 24 抗原モノクローナル抗体の精製

- 15 ヒト型化抗 HM 1. 24 抗原モノクローナル抗体含有試料 (CHO 細胞で培養した培養上清) をプロテイン A アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いる方法で以下の表 4 に記載の条件により精製した。なお、HM 1. 24 抗原モノクローナル抗体は、国際特許出願公開番号 WO 98 / 14580 号公報に記載の方法によって作成した (等電点 : pH 9.0)。

3. 1. 実験条件

- 20 カラム : rProtein A FF, 5 mL (16 mmID x 25 mmH)
 流速 : 5 mL / min (150 cm / h)
 サンプル : 培養上清直接負荷

表 4

平衡化 (20CV)	10 mM C-P Buffer, 1 M NaCl, pH 7.5
負荷	CM 直接負荷

洗浄 1 (20CV)	10 mM C-P Buffer, 1 M NaCl, pH 7.5
洗浄 2 (20CV)	10 mM C-P Buffer, pH 7.5
溶出 (10CV)	クエン酸, pH 2.5
洗浄 3 (4CV)	0.1 M NaOH

プロテイン A カラムを 150mM NaCl 入りクエン酸-リン酸緩衝液 pH7.5 で十分に平衡化した後、上記抗体含有 CM を負荷した。続いて結合していない不純物を 150mM NaCl 入りクエン酸-リン酸緩衝液 pH7.5 で洗浄、更に導電率を下げる
 5 目的でクエン酸-リン酸緩衝液 pH7.5 で洗浄を行い、その後 20mM クエン酸水溶液にて溶出を実施した。溶出プロファイルを A280nm で監視し、タンパク質ピークを分取した。このプロテイン A 溶出画分を用いて以下の条件検討を実施した。

3. 2. 溶出後の残存 DNA 除去条件検討

残存 DNA を効率的に除去するために、フィルター濾過時の最適 pH 条件を設定する検討を行った。プロテイン A 溶出画分を、1.0M Tris 水溶液により以下の
 10 各検討 pH(pH = 4.5 - 7.5)に調整した。その後、一定時間放置し、0.22um CA フィルター濾過処理を行った。その後 1.0M Tris 水溶液により pH7 に調整し、DNA 定量及び逆相カラムによるヒト型化抗HM1. 24 抗原モノクローナル抗体の定量を行った。表 5 に DNA 量の測定結果を、また表 6 にヒト型化抗HM1. 24
 15 抗原モノクローナル抗体の収量測定の結果を示す。

表 5

残存 DNA 除去の検討 (単位 : pg/ml)

実験 1

	pH 7.5	pH 6.5	pH 5.5
0h	1142	624	113
6h	3288	1157	117

20 (培養上清中の DNA : 235200 pg/ml)

実験 2

	pH 5.5	pH 5.0	pH 4.5
0h	137	67	86
6h	94	34	164

(培養上清中の DNA : 5448000 pg/ml,

フィルター濾過処理を行う前の試料中の DNA : 4330 pg/ml)

表 6

5 フィルター処理によるヒト型化抗HM1. 2 4 抗原モノクローナル抗体回収率

	pH 5.5	pH 5.0	pH 4.5
0h	98.1%	89.6%	87.8%
6h	89.3%	91.1%	98.6%

Protein A アフィニティークロマトグラフィー精製した後のサンプルにおいては大量の DNA が存在していたが、実験 1 では pH 7.5, 6.5, 5.5 と pH の低下に従って DNA 量が減少しており、また時間は 0 時間の方が DNA 除去率が高い傾向
 10 があった。実験 2 では pH = 4.5, 5.0, 5.5 の条件で同様の実験を行ったが、この間においては pH および時間に関係なく十分に DNA が同程度に除去されていた。更に回収量の計算からヒト型化抗HM1. 2 4 抗原モノクローナル抗体はほとんど消失していないことが判明した。

15 実施例 4 : 顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の精製

G-CSF 含有試料 (CHO 細胞で培養 : 中外製薬製) を用いて以下の条件検討を実施した (等電点 : pH 5.5 ~ 5.7)。

4. 1. 溶出後の残存 DNA 除去条件検討

20 残存 DNA を効率的に除去するために、フィルター濾過時の最適 pH 条件を設定する検討を行った。G-CSF 含有試料に低伝導度の酸性溶液 (2.5mM HCl 水溶液) を添加し、更に 20% 塩酸を用いて低伝導度の酸性水溶液状態とし、更に試料 DNA を添加した。1.0M Tris 水溶液により以下の各検討 pH (pH = 4.3 又は 6.6) に調整し、続いて 0.22µm CA フィルター濾過処理を行った。その後、ろ過前後の画分の DNA 定量を行った。表 8 に DNA 量の測定結果を示す。

25

表 7

残存 DNA 除去の検討 (単位 : pg/ml)

濾過時 pH	pH 6.6	pH 4.3
濾過前	4.3×10^5	4.3×10^5
濾過後	2.8×10^4	< 90

上記検討結果より濾過時 pH4.3 の場合において DNA を多量に含んだ G-C-S-F 含有試料から DNA 量が効率的に減少し定量限界以下であった。

5 実施例 5 : h P M-1 (ヒト型化抗 I L-6 レセプター抗体) 精製におけるウイルス除去効果

5. 1 検討材料 (抗体含有試料)

h P M-1 抗体 (ヒト型化 I L-6 レセプター抗体) 産生 CHO 細胞培養上清液 (CM) (細胞遠心済み: -80℃ 保存) 含有試料に、それぞれ X-MuLV、Reo

10 3、MVM を添加後、各 CM を 0.45 μ m フィルター (ボトルトップフィルター: CORNING 社製) を用いてろ過し、精製検討用に使用した。なお、h P M-1 抗体は、実施例 1 と同様に作成した。なお、使用した各ウイルスは ATCC (American Type Culture Collection) から入手した。

5. 2 rProtein Column Chromatography での精製

15 5. 1 で作製したウイルス添加試料を rProtein Column Chromatography で精製した。具体的な条件は以下の通りである。

樹脂: rProteinA Sepharose Fast Flow

機器: AKTA explorer100、AKTA purifier

カラム: XK16/20、XK16/40

20 樹脂高: 11.5 cm

溶出条件

平衡化: 1 mol/L NaCl, 20 mmol/L C-P Buffer,
pH7.5 \pm 0.2, Conductivity 8.5 \pm 0.5 S/m

洗浄 1: 1 mol/L NaCl, 20 mmol/L C-P Buffer,
25 pH7.5 \pm 0.2, Conductivity 8.5 \pm 0.5 S/m

洗浄 2: 10 mmol/L C-P Buffer,
pH7.7 \pm 0.2, Conductivity 165 \pm 20 mS/m

溶出：2.5 mmol/L HCl,

pH2.7±0.2, Conductivity 107±10 mS/m

5. 3 低pH処理

5. 2 で得られた溶出画分を1 mol/L 塩酸で pH3.2 ± 0.1 に調整し、室温15 ± 5℃
5 で30分以上保持した。その後、各溶出画分を300 mmol/L Tris 溶液で pH7.2 ± 0.1 に調整した。そのうちの40.0 mL を、グラスファイバーフィルター（Millipore 社製）（0.2 μm、PALL 社製）を一次側、バイオイナート（0.2 μm、PALL 社製）（PALL 社製のフィルターホルダーに直径15 mm のアジャスターを装着）を二次側になるよう連結したろ過ユニットを用いて0.03 ± 0.01 MPa で加圧ろ過した。

10 5. 4 ウイルスの検出

採取したサンプルは全て TCID₅₀ で測定を行った。また、X-MuLV および MVM のクリアランス能試験では、検出細胞へのウイルス感染力を指標とした TCID₅₀ に加え、画分中のウイルス量を定量できる RT/Q-PCR および Q-PCR による測定を行った。

15 5. 5 結果

5. 4 の測定の結果を以下の表に示す。

表8 ウイルス力価（TCID₅₀ 法：Log₁₀/mL）

	Reo3		MVM	
	Run 1	Run 2	Run 1	Run 2
ろ過前	5.76	5.76	4.80	4.18
ろ過後	≤1.03	≤1.03	≤1.03	≤1.03

20 表9 ウィルス力価（PCR：Log₁₀ Copies/5μL）

	X-MuLV		MVM	
	Run 1	Run 2	Run 1	Run 2
ろ過前	5.05	4.77	4.18	2.83
ろ過後	≤1.90	≤1.90	≤1.30	≤1.90

以上のように、本発明の精製工程により、いずれのウイルスについても非常に高い LRV（Logarithmic Reduction Value）が得られ、低 pH 処理・ろ過後では定

量限界以下にまで除去されていることが確認された。

産業上の利用可能性

- 本発明の方法により、DNA夾雑物やウイルスといった不純物を極めて簡単な
- 5 方法で、効率よく除去することが可能となり、生理活性タンパク質、特に抗体の精製がはるかに効果的となった。不純物がDNAである場合には、DNA濃度を極めて低濃度に（例えば 22.5pg/ml）、不純物がウイルスである場合には、ウイルス力価を極めて低い値に（例えば TCID₅₀ 法で 1. 0 3 (Log₁₀/mL の表記による)）することができた。また、本発明の方法によりコストを低減することがで
- 10 き、格別の技術的意義を有するものである。

請求の範囲

1. 以下の段階：
 - 1) 生理活性タンパク質含有試料を、該生理活性タンパク質の等電点以下の pH の低伝導度の水溶液状態とし、
 - 5 2) 生じる粒子を除去する、
を含む、生理活性タンパク質含有試料中の不純物を除去する方法。
2. 低伝導度の水溶液の伝導度が、0～100mMのモル濃度である請求項 1 に記載の方法。
3. 低伝導度の水溶液のイオン強度が、0～0.2 である請求項 1 又は 2 に記載の方法。
- 10 4. 低伝導度の水溶液の導電率が、0～300 mS/m である請求項 1～3 のいずれかに記載の方法。
5. 水溶液が塩酸、クエン酸、酢酸の水溶液から選択される請求項 1～4 のいずれかに記載の方法。
- 15 6. 水溶液の pH が生理活性タンパク質の等電点以下、かつ pH 2.0 以上である請求項 1～5 のいずれかに記載の方法。
7. 不純物が DNA 夾雑物である請求項 1～6 のいずれかに記載の方法。
8. 不純物がウイルスである請求項 1～6 のいずれかに記載の方法。
9. DNA 夾雑物除去処理後の生理活性タンパク質含有試料中の DNA 夾雑物が
- 20 DNA 濃度 22.5pg/ml 以下である請求項 7 に記載の方法。
10. 生理活性タンパク質が抗体である請求項 1～9 のいずれかに記載の方法。
11. 抗体が IgG 抗体である請求項 10 に記載の方法。
12. 抗体がヒト型化モノクローナル抗体である請求項 10 または 11 に記載の方法。
- 25 13. 抗体がヒト型化抗 IL-6 レセプター抗体である請求項 12 に記載の方法。
14. 抗体がヒト型化抗 HM1.24 抗原モノクローナル抗体である請求項 12 に記載の方法。
15. 抗体がヒト型化抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体（抗 PTHrP 抗体）である請求項 12 に記載の方法。

16. 生理活性タンパク質が顆粒球コロニー刺激因子である請求項1～9のいずれかに記載の方法
17. 粒子をフィルター濾過によって除去する請求項1～16のいずれかに記載の方法。
- 5 18. 生理活性タンパク質含有試料を低伝導度の酸性またはアルカリ性水溶液状態とし、得られる試料に緩衝液を添加してpHを該生理活性タンパク質の等電点以下のpHに調整することによって1)の工程を行う、請求項1に記載の方法。
19. 生理活性タンパク質が抗体であって、該抗体含有試料をプロテインAもしくはプロテインGのアフィニティークロマトグラフィーに適用して、低伝導度の
- 10 酸性水溶液で溶出し、得られる溶出液に緩衝液を添加してpHを該抗体の等電点以下のpHに調整することによって1)の工程を行う、請求項1に記載の方法。
20. 緩衝液がTris水溶液である請求項18又は19記載の方法。
21. 請求項1～20のいずれかに記載の方法によって得られる精製生理活性タンパク質。
- 15 22. 請求項1～20のいずれかに記載の方法を用いた精製工程を含む、医療用タンパク質製剤の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/11642

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C07K1/14, C07K16/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C07K1/00-C07K19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2000-319294 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 21. November, 2000 (21.11.00), Claims; examples (Family: none)	1-18, 20 19
X Y	WO 99/19343 A1 (Ortho-Clinical Diagnostic Systems, Inc.), 22 April, 1999 (22.04.99), Claims; examples; drawings & JP 2002-5000164 A & US 6096872 A	1-6, 8, 10-18, 20 7, 9, 19
X	JP 2000-351799 A (JCR Pharmaceuticals Co., Ltd.), 19. December, 2000 (19.12.00), Claims; examples (Family: none)	1-6, 8, 17-18, 20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
22 October, 2003 (22.10.03)

Date of mailing of the international search report
04 November, 2003 (04.11.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11642

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/3706 A1 (Croix-Rouge de Belgique), 06 February, 1997 (06.02.97), Claims; examples & JP 10-506607 A & EP 840624 A1 & US 6190608 B1	1-6, 8, 17-18, 20
Y	EP 610729 A1 (Dr.Karl Thomae GmbH.), 17 August, 1994 (17.08.94), Full text & JP 7-48399 A & DE 4302163 A1	19
P,X	EP 1247818 A2 (Ortho-Clinical Diagnostic Systems, Inc.), 09 October, 2002 (09.10.02), Full text & JP 2003-64099 A	1-6, 8, 10-18, 20
X	EP 1225180 A2 (Probitas Pharma, S.A.), 24 July, 2002 (24.07.02),	1-6, 8, 10-18, 20
Y	Claims; examples & JP 2003-2896 A & ES 2184594 A1 & US 2002/151688 A1	7, 9, 19
A	WO 96/35710 A1 (Suomen Punainen Risti Veripalvelu), 14 November, 1996 (14.11.96), Full text & EP 825998 A1 & JP 11-504644 A	1-20
A	WO 94/20525 A1 (Schering Corp.), 15 September, 1994 (15.09.94), Full text & EP 688335 A1 & US 5710251 A & KR 178304 B	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11642

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 21-22

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

As a purified physiologically active protein obtained by a method involving definite purification steps as described in claims 21 to 22, only several specific examples are presented in the description. Thus, claims 21 and 22 are neither supported by the description nor (continued to extra sheet)

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11642

Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sheet(1)

disclosed therein. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is completely unknown what purified physiologically active proteins correspond thereto. Such being the case, no meaningful search can be made on the inventions according to the above claims.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int Cl⁷ C07K1/14, C07K16/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int Cl⁷ C07K1/00-C07K19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 2000-319294 A (旭化成工業株式会社), 2000. 11. 21. 特許請求の範囲、各実施例 (ファミリーなし)	1-18, 20 19
X Y	WO 99/19343 A1 (Ortho-Clinical Diagnostic Systems, Inc.), 1999. 04. 22. 特許請求の範囲、各実施例、各図 & JP 2002-5000164 A & US 6096872 A	1-6, 8, 10-18, 20 7, 9, 19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 10. 03

国際調査報告の発送日

04.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 耕一郎

4B 9636

電話番号 03-3581-1101 内線 3446

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2000-351799 A (日本ケミカルリサーチ株式会社) , 2000. 12. 19, 特許請求の範囲、各実施例 (ファミリーなし)	1-6, 8, 17-18, 20
X	WO 97/3706 A1 (Croix-Rouge de Belgique) , 1997. 02. 06, 特許請求の範囲、各実施例 &JP 10-506607 A &EP 840624 A1 &US 6190608 B1	1-6, 8, 17-18, 20
Y	EP 610729 A1 (Dr. Karl Thomae GmbH) , 1994. 08. 17, 文献全体 &JP 7-48399 A &DE 4302163 A1	19
P, X	EP 1247818 A2 (Ortho-Clinical Diagnostic Systems, Inc.) , 2002. 10. 09, 文献全体 &JP 2003-64099 A	1-6, 8, 10-18, 20
X	EP 1225180 A2 (Probitas Pharma, S. A.) , 2002. 07. 24, 特許請求の範囲、各実施例	1-6, 8, 10-18, 20
Y	&JP 2003-2896 A &ES 2184594 A1 &US 2002/151688 A1	7, 9, 19
A	WO 96/35710 A1 (Suomen Punainen Risti Veripalvelu) , 1996. 11. 14, 文献全体 &EP 825998 A1 &JP 11-504644 A	1-20
A	WO 94/20525 A1 (Schering Corp.) , 1994. 09. 15, 文献全体 &EP 688335 A1 &US 5710251 A &KR 178304 B	1-20

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 21-22 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
明細書には、請求の範囲21-22に記載されたような所定の精製工程を含む方法により得られる精製生理活性タンパク質としては、具体的なものが数例記載されているのみである。よって、請求の範囲21-22は明細書による裏付けを欠き、開示も欠いている。また出願時の技術常識を勘案しても、いかなる精製生理活性タンパク質が該当するのか全く不明である。よって、前記請求の範囲に記載された発明について、有意義な調査ができない。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。